جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الكشف مظهرياً وجزيئياً عن بعض مسببات الأخماج البكتيرية لمرضى داء الذئب الاحمراري الجهازي في مدينة الموصل

نادية خالد مصطفى حامد العبيدي

رسالة ماجستير

إشراف
الدكتورة سحر سالم بطرس

1444 هـ
2023 م

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 75 عينة سريرية من مرضى مشخصين بداء الذئب الأحمراري Systemic Lupus Erythematosus (SLE) سواء من المرضى الراقدين أم المراجعين لمستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل لأغراض تلقي العلاج وللمُدَّة من شهر تشرين الثاني 2021 إلى شهر نيسان 2022. شملت العينات السريرية 60 عينة من الإدرار ،8 مسحات من التقرحات الفموية، 5 عينات القشع، ومسحة من القيح المأخوذ من جرح واذن.

كما جمعت 10 عينات لغسول الفم من 10 من مرضى الـ SLE في مُدَّة سكون المرض، و 10 عينات لغسول فم لأشخاص اصحاء كعينة سيطرة (مقارنة).

شخصت العزلات النامية على الأوساط الزرعية الانتخابية والغنية بالطرائق التقليدية وباستخدام أشرطة API20E و API® STAPH وجهاز Vitek-2، وتم تأكيد التشخيص بوساطة الطرائق الجزيئية المعتمدة على 16S rRNA، ثم مقارنة التتابعات في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية (National Center for Biotechnology Information(NCBI) وباستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

شخصت 70 عزلة بكتيرية من العينات السريرية، 22 (31.4%) منها موجبة لصبغة كرام، و 48 (68.6%) سالبة لصبغة كرام. توزعت العزلات الموجبة كما يأتي 14 عزلة من الإدرار، 3 من القشع، 5 من تقرحات الفم، أَمَّا العزلات السالبة فكانت 41 عزلة من الإدرار، عزلتين من القشع، 3 عزلات من التقرحات الفموية وعزلة واحدة لكل من قيح الجرح والأُذن.

كانت السيادة للبكتيريا الموجبة لصبغة كرام لـ *Staphylococcus aureus* المعزولة بنسبة (14.3%)، أَمَّا البكتيريا السالبة لصبغة كرام فالسيادة لـ *Pseudomonas aeruginosa* التي عزلت بنسبة (24.3 %).

شملت البكتريا الموجبة لصبغة كرام كل من:

Staphylococcus aureus, *Staph. haemolyticus*, *Staph. Warneri*, *Staph. epidermidis*, *Kocuria kristinae*, **Granulicatella elegans*, **Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae*.

أَمَّا البكتيريا السالبة لصبغة كرام فشملت كل من:

*Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas luteola, *Pseudomonas oryzihabitans, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, *Cronobacter sakazakii, Klebsiella pneumoniae, *Serratia fonticola, Proteus mirabilis, *Proteus penneri, *Proteus vulgaris, *Providencia stuartii, Acinetobacter baumannii, *Ochrobactrum anthropi, Salmonella typhi* and *Aeromonas hydrophila.*

أُجري اختبار الحساسية تجاه العديد من المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية وبحسب نوع العينة ونوع البكتيريا، ثم تم تحديد Multidrug Resistant (MDR) و Extensively (XDR) Drug Resistant و Pan Drug Resistant (PDR) للعزلات، إذ بلغت لبكتيريا *Staphylococcus aureus* 20%,70%,10% على التوالي ولبكتيريا *E.coli* 50%، 20%، 20% ولـ *Pseudomonas aeruginosa*88.2%، 5.9%، 5.9% على التوالي .

لدراسة بعض من عوامل ضراوة بكيتريا *Pseudomonas aeruginosa* كونها المعزولة بنسبة أَعلى من العينات السريرية، تم الكشف مظهريا عن قابلية 10 عزلات منها (التي اظهرت أَعلى مقاومة للمضادات الحيوية) على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة الزرع على وسط أَكار الكونغو الأَحمر Congo Red Agar ، أَظهرت 4 عزلات منها نتيجة إيجابيَّة. ثم تم التحري جزيئيًا عن تكوين الغشاء الحيوي بالكشف عن المورثين *PilA , pslÁ* بتفاعل PCR وباستخدام البوادئ الخاصة بهما، إذ أَظهرت النتائج امتلاك العزلات الأَربعة على المورث *pslÁ* فيما امتلكت ثلاث منها المورث *PilA*. كما تم التحري جزيئيًا عن مورثات المقاومة لبعض المضادات الحيوية وهما المورثين *mexA, bla*$_{CTX-M1}$ في عزلات *Pseudomonas aeruginosa*\الأَربعة، وأَظهرت النتائج امتلاك العزلات الأَربعة للمورث *mexA*، فيما امتلكت عزلتين فقط المورث *bla*$_{CTX-M1.}$

أَظهرت نتائج زرع عينات غسول الفم سيادة أَنواع من البكتريا الانتهازية السالبة لصبغة كرام في فم مرضى SLE، إذ شخصت 18 عزلة مقارنة بـ 4 عزلات من فم الأَصحَّاء. وشخصت 12 عزلة موجبة لصبغة كرام تابعة للجنس Staphylococcus مقارنة بـ 6 عزلات من فم الأَصحَّاء.

شملت البكتريا الموجبة لصبغة كرام كل من:

Staphylococcus aureus, *Staph. haemolyticus*, *Staph. warneri*, *Staph. epidermidis* and *Staph. saprophyticus*.

اما البكتيريا السالبة لصبغة كرام شملت كل من:

*Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Escherichia coli, *Enterobacter gergoviae, Klebsiella pneumoniae, * Acinetobacter baumannii, * Alcaligenes faecalis*.

الجدير بالذكر أَنَّ أَنواع البكتريا المؤشرة بالعلامة * عزلت محليا للمرة الاولى من مرضى SLE.

.

Abstract

In the present study, (75) clinical specimens were collected from diagnosed Systemic Lupus Erythematous (SLE) patients (inpatients and outpatients) during the period from November/2021 - April /2022. Specimens consisted of (60) urine samples, (8) oral ulcers swabs, (5) sputum and one pus sample taken from each of wound and ear . In addition to (10) oral rinse samples from SLE patients at its latent period and (10) oral rinse samples from healthy people to be used as control.

All bacterial isolates grown on selective and enriched media were identified using conventional methods, API E 20 , API@ STAPH , and Vitek-2 and finally confirmed by using the more reliable 16S rRNA molecular identification methods. Gene sequencing was compared with National Center for Biotechnology Information (NCBI) by using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) .

The identification results of (70) bacterial isolates obtained from clinical samples were as follows; 22 (31.4%) were gram positive, 48 (68.6%) gram negative. Of the gram positive bacteria (14) were isolated from urine, (3) from sputum and (5) from oral ulcer. On the other hand, gram negative bacteria consisted of (41) urine isolate, (2) from sputum samples, (3) from oral ulcers, and (2) pus samples from wound and ear.

The most prevalent gram positive bacteria were:

Staphylococcus aureus, *Staph. haemolyticus*, *Staph. Warneri*, *Staph. epidermidis*, *Kocuria kristinae*, *Granulicatella elegans*, **Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae*.

Furthermore, gram negative bacteria included:

*Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas luteola, *Pseudomonas oryzihabitans, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, *Cronobacter sakazakii, Klebsiella pneumoniae, *Serratia fonticola, Proteus mirabilis, *Proteus penneri, *Proteus vulgaris, *Providencia stuartii, Acinetobacter baumannii, *Ochrobactrum anthropi, Salmonella typhi* and *Aeromonas hydrophila.*

Antimicrobial sensitivity testing was carried out for all isolates according to the type of bacteria. Multidrug Resistance (MDR), Extensively Drug Resistance (XDR) and Pan Drug Resistance were also determined. Results for *Staphylococcus aureus* were 10%, 70%, and 20% respectively. In case of *E. coli*, results were 50%, 20%, 20%, and for *Pseudomonas aeruginosa* 88.2%, 5.9% and 5.9% respectively.

Virulence factors for the most prevalent bacteria isolated, *Pseudomonas aeruginosa* were also studied. Detection of biofilm formation for 10 multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* was detected by Congo red agar method. Positive results were observed by four (4) isolates. Additionally, molecular detection of two genes *PilA and pslÁ* was performed using PCR technique and their specific primers. All four isolates demonstrated the presence of *pslÁ* while only three carried the gene *PilA.* Similarily, the presence of antimicrobial resistance genes (*mexA,* $bla_{CTX\text{-}M1}$) was carried out and it was found that all four isolates contained *mexA* gene while only two isolates contained the gene $bla_{CTX\text{-}M1}$.

The current study also demonstrated the prevelance of many types of opportunistic gram negative bacteria present in oral rinse samples of SLE patients. This was manifested by isolation of 18 bacterial isolates as compared with (4) obtained from healthy people. 12 gram positive bacteria were diagnosed as Staphylococcus compared to (6) isolates from control . Gram positive bacteria included each of:

C

Staphylococcus aureus , *Staph. haemolyticus*, *Staph. warneri*, *Staph. epidermidis*, *Staph. Saprophyticus*.

While gram negative bacteria included:

*Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Escherichia coli, *Enterobacter gergoviae, Klebsiella pneumoniae, * Acinetobacter baumannii, * Alcaligenes faecalis*.

An interesting finding was that bacterial names assigned with (*) were isolated from local SLE patients for the first time as far as we know.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of biology

Morphological and Molecular detection of some bacterial infection in Systemic Lupus Erythematosus in Mosul city

Nadia Khalid Mustafa Hamed Al obaidy

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Dr. Sahar Salim Petrus Dawood

1444 A.H. **2023 A.D.**